

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Mainz
(Direktor: Prof. Dr. G. Kuschinsky)

**Hemmung der Na^+ - K^+ -Aktivierten
Adenosintriphosphatase aus Rattenhirn
Durch Chlorpromazin, Promazin,
Imipramin und durch deren
Monodesmethylderivate**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Herwig Hackenberg
aus Unter Sandau bei Marienbad

Mainz 1971

1972
—

Fotodruck: Erich Mauersberger, Marburg

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Mainz
(Direktor: Prof. Dr. G. Kuschinsky)

**Hemmung der Na^+ - K^+ -Aktivierten
Adenosintriphosphatase aus Rattenhirn
Durch Chlorpromazin, Promazin,
Imipramin und durch deren
Monodesmethylderivate**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Herwig Hackenberg
aus Unter Sandau bei Marienbad

Mainz 1971

Dekan: Prof. Dr. Dr. W. Ketterl

Referent: Prof. Dr. Dr. J. Krieglstein

Korreferent: Prof. Dr. G. Kuschinsky

Tag der mündlichen Prüfung: 18. Januar 1972



I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

1.	E I N L E I T U N G	1
2.	M E T H O D E N	6
2.1.	Herstellung der Mikrosomen	6
2.2.	Eiweißbestimmung der Mikrosomensuspension	8
2.3.	Bestimmung der ATPase-Aktivität	8
2.4.	Phosphatbestimmung	9
3.	E R G E B N I S S E	11
3.1.	Aktivität der Adenosintriphosphatase	11
3.2.	Aktivität der Na-K-ATPase in Abhängigkeit von der Inkubationszeit	11
3.3.	Aktivität der Na-K-ATPase in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration	14
3.4.	Bestimmung der Hemmung der Na-K-ATPase durch Chlorpromazin, Promazin, Imipramin und deren Monodesmethylderivate	14
3.5.	Statistische Sicherung der Unterschiede in der Hemmung zwischen Ausgangssubstanz und der Monodesmethylverbindung	17
3.6.	Hemmung der Na-K-ATPase durch die Monodesme- thylderivate von Chlorpromazin, Promazin und Imipramin im Vergleich zu den Ausgangssubstan- zen bei verschiedenen Kaliumkonzentrationen ...	21
4.	D I S K U S S I O N	26
4.1.	Hemmung der Na-K-ATPase	26
4.2.	Gegenüberstellung der Hemmung der Na-K-ATPase durch trizyklische Psychopharmaka und durch Herzglykoside	33
4.3.	Bezugssystem der Wirkung der Phenothiazin- und Iminodibenzyllderivate	36
4.4.	Wirkungsänderung der trizyklischen Psychophar- maka durch Umwandlung zu Monodesmethylderi- vaten	39
5.	Z U S A M M E N F A S S U N G	41
6.	L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S	43



Digitized by the Internet Archive
in 2026

1. E I N L E I T U N G

Bei der Untersuchung der Korrelation zwischen Hydrophobie und Eiweißbindung verschiedener Psychopharmaka (KRIEGLSTEIN, 1970; GLASSER u. KRIEGLSTEIN, 1970) konnte gezeigt werden, daß innerhalb einer einheitlichen Substanzgruppe (z.B. Phenothiazinderivate, Iminodibenzyl-derivate) eine Beziehung zwischen dem Octanol-Wasser-Verteilungsquotienten und einer Größe der Albuminbindung besteht. So kann aus dieser Beziehung die Eiweißbindung einer substituierten Verbindung berechnet werden, wenn die Substitution nur den hydrophoben Charakter der Substanz beeinflußt.

Im Rahmen dieser Arbeiten zeigte sich bei der Untersuchung der Monodesmethylderivate von Chlorpromazin, Promazin und Imipramin, daß die berechnete Eiweißbindung von der experimentell bestimmten Eiweißbindung stark abweicht. Beim Vergleich der Eiweißbindung der Monodesmethylderivate mit der Eiweißbindung der Ausgangssubstanzen ergab sich bei der berechneten Eiweißbindung ebenfalls eine große Differenz - die experimentell bestimmte Eiweißbindung war jedoch nur geringfügig verändert. Der dieser Berechnung zugrundeliegende Verteilungsquotient beträgt bei den Monodesmethylderivaten nur den zehnten Teil im Vergleich zu den Ausgangssubstanzen.

Die Bindung dieser Substanzen an das Eiweiß erfolgt einerseits durch das trizyklische Ringsystem und andererseits durch die Seitenkette. Das trizyklische Ringsystem geht hydrophobe Wechselbeziehungen mit dem Eiweiß ein. Der Stickstoff der Seitenkette wird bei einem physiologischen pH protoniert und bildet eine Ionenbindung aus. Da die experimentell bestimmte Eiweißbindung der Monodesmethylderivate nur geringfügig gegenüber der Eiweißbindung der Ausgangssubstanzen verändert ist, muß bei den Monodesmethylderivaten im Vergleich zu den Ausgangssubstanzen die Ionenbindung auf Kosten der hydrophoben Bindung zugenommen haben.

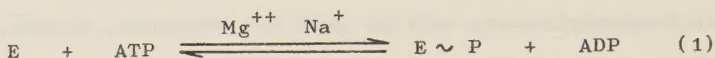
Bei der isolierten Perfusion der Rattenleber erfolgt eine rasche Demethylierung der Phenothiazinderivate mit einer Dimethylaminogruppe zu Monodesmethylderivaten (KRIEGLSTEIN, 1970; BICKEL et al., 1963 u. 1967; FORREST u. FORREST, 1963). Bei der isolierten Gehirnpfusion (Ratte) mit Phenothiazinderivaten (KRIEGLSTEIN, 1970), bei der keine nachweisbaren Metaboliten entstehen, ist die Fähigkeit der Monodesmethylderivate, die Bluthirnschranke zu passieren, wenig eingeschränkt. So erscheint eine Beteiligung der Metaboliten am Gesamtwirkungsbild der Ausgangssubstanzen möglich. Es gibt weiter Hinweise dafür, daß die antidepressive Wirkungskomponente an die Desmethylstruktur geknüpft ist (BICKEL et al., 1963 u. 1967; BICKEL, 1968; STACH u. PÖLDINGER, 1966; AHTHEE u. PAASONEN, 1968; MAXWELL et al., 1969).

Die Desmethylierung erfolgt auch bei Menschen, Hunden, Katzen und Kaninchen, neben anderen Umwandlungen, wie FORREST et al. (1968) am Beispiel der Chlorpromazin-metaboliten im Urin gezeigt haben.

Bei der Untersuchung der Verteilung von Chlorpromazin in Hunden konnte weiter gezeigt werden (SALZMAN u. BRODIE, 1956), daß eine Anreicherung im Gehirn erfolgt und hier wiederum vornehmlich in der Hirnrinde festzustellen ist (GOUZON et al., 1954).

Es ist interessant, daß in der Hirnrinde, verglichen mit den übrigen Körpergeweben, auch die weit höchste Aktivität des erstmalig von SKOU (1957) untersuchten Enzyms einer Na^+ - K^+ -aktivierten Adenosintriphosphatase* festzustellen ist, wie es BONTING et al. (1961) an Katzen gezeigt haben. Dieses Enzym, das in verschiedenen Geweben verschiedener Tierarten nachgewiesen wurde (ref. SKOU, 1965; NAKAO et al., 1965; ref. ALBERS, 1967), ist in mikrosomalen Partikeln lokalisiert und wird als das aktive Transportsystem von Na^+ und K^+ durch die Zellmembran betrachtet (SKOU, 1965 u. 1967; ALBERS, 1967; ALBERS et al., 1968), wobei das Adenosintriphosphat in einer mehrstufigen Reaktion gespalten wird:

* Die Na^+ - K^+ -abhängige Adenosintriphosphatase wird im weiteren Text mit Na-K-ATPase bezeichnet.



(E = Na-K-ATPase, P = gebundene Phosphorsäure,
P_i = freies Phosphat)

Diese Na-K-ATPase wird unter anderem durch Phenothiazin- und Iminodibenzyllderivate gehemmt (JÄRNEFELT, 1962; JUDAH u. AHMED, 1964; SQUIRES, 1965; DAVIS u. BRODY, 1966; ROBINSON et al., 1968). Vergleicht man die von KRIEGLSTEIN (1970) gefundene Eiweißbindung, d.h. den prozentualen Anteil B an gebundenem Pharmakon, mit der von DAVIS und BRODY (1966) gefundenen Hemmung der aus Rattenhirn isolierten Na-K-ATPase der gleichen Verbindungen - wie dies in Tab. 1 dargestellt ist -, so ist

Tab. 1: Gegenüberstellung der Eiweißbindung (KRIEGLSTEIN, 1970) und Hemmung der Na-K-ATPase (DAVIS u. BRODY, 1966) durch Phenothiazinderivate.

c = Phenothiazingesamtkonzentration

	Albuminbindung in % für $c=10^{-4}M$	Hemmung der Na-K-ATPase in % für $c=10^{-4}$
Promazin	49	6,4
Promethazin	62	30
Chlorpromazin	70	38
Triflupromazin	77	65

festzustellen, daß die Hemmung der Na-K-ATPase gleichsinnig mit der zunehmenden Eiweißbindung dieser Psychopharmaka steigt.

Zusammenfassend kann man also feststellen, daß bei den Monodesmethylderivaten die experimentell bestimmte Eiweißbindung, die gegenüber der Eiweißbindung der Ausgangssubstanzen nur geringfügig verändert ist, von der aus dem Verteilungsquotienten berechneten Eiweißbindung stark abweicht. Darüber hinaus besteht eine Beziehung zwischen der Eiweißbindung einiger trizyklischer Psychopharmaka und der Hemmung der Na-K-ATPase durch diese Substanzen.

Hieraus ergab sich die Frage, wie sich die Monodesmethylderivate gegenüber der Na-K-ATPase verhalten bzw. ob mit der aus der stärkeren Basizität resultierenden ionogenen Bindung am Eiweiß, die auf Kosten der hydrophoben Bindung geht, auch eine stärkere Hemmung der Na-K-ATPase verbunden ist.

Um hierüber näheren Einblick zu erhalten, wurden nachstehende Untersuchungen durchgeführt, bei denen die Hemmung der Na-K-ATPase durch die Monodesmethylderivate von Chlorpromazin, Promazin und Imipramin mit der Hemmung des Enzyms durch die Ausgangssubstanzen (Dimethylaminoverbindungen) verglichen wurde.

2. M E T H O D E N

2.1. Herstellung der Mikrosomen

Bei der Präparation der Mikrosomen kommt es darauf an, ein Enzym zu erhalten, das bei einer möglichst hohen $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{Mg}^{++}$ -abhängigen Aktivität eine möglichst geringe Mg^{++} -abhängige Aktivität hat. Da primär beide Aktivitäten nebeneinander vorkommen, wird dies bei der Präparation des Enzyms durch selektive Herabsetzung, Hemmung oder Zerstörung der Mg^{++} -abhängigen Aktivität erreicht. Hierzu wurden in der Literatur verschiedene Methoden angegeben, wie Aufbewahren bei 0° (DEUL u. McILWAIN, 1961), bei -5° (SCHWARTZ, 1963), bei -20° (SKOU, 1962), eine lange Vorinkubation (HOKIN et al., 1964), Desoxycholsäure (SKOU, 1962), Erhitzen und anschließende Behandlung mit Detergentien (SOMOGYI, 1964), Erwärmen auf 40° für 30 Min bei pH 5,0 in Gegenwart von Na^+ (SQUIRES, 1965), Natriumjodid (NAKAO et al., 1965) und eine hitzestabile, histonähnliche, aus verschiedenen Geweben extrahierbare Substanz (SCHWARTZ, 1965). Ein Vergleich der Behandlung mit Natriumjodid und Desoxycholsäure ergab, daß die Natriumjodidbehandlung vorteilhafter ist, da bei dieser ein Enzympräparat mit einer sehr geringen Mg^{++} -Aktivität erhalten wird (TASHIMA et al., 1966; ROBINSON, 1967).

Die Präparation der Mikrosomen erfolgte somit in Anlehnung an Arbeiten von NAKAO et al. (1965), DAVIS und BRODY (1966) und AKERA und BRODY (1968).

Nach einer Reihe von orientierenden Versuchen wurden die Gehirne von 30 weiblichen Sprague-Dawley-Ratten von 150 bis 200 g Lebendgewicht verwendet, die 50 g Gehirn ergaben. Die Gehirne wurden sofort nach Dekapitation entnommen und in eine eisgekühlte Lösung, in der sie später homogenisiert wurden, eingebracht. Alle weiteren Arbeiten wurden bei einer Temperatur von 0 bis 4° ausgeführt. Die Gehirne wurden mit einem Glasstab weitgehend zerdrückt und anteilsweise im fünffachen Volumen einer Lösung, die 0,25 M Saccharose, 5 mM Histidin, 5 mM EDTA und 0,2 % Desoxycholsäure enthielt, zunächst mit einem Homogenisator mit motorbetriebem Teflonpistill und danach mit einem Glashomogenisator homogenisiert. Das Homogenat wurde bei 12000 g 30 Minuten zentrifugiert, um Gewebsstücke, Zellen sowie deren Teile, Kerne und Mitochondrien abzutrennen. Der Überstand wurde bei 35000 g 30 Minuten zentrifugiert, die Mikrosomen in einer Lösung, die 0,25 M Saccharose, 5 mM Histidin und 1 mM EDTA enthielt, resuspendiert und erneut bei 35000 g 30 Minuten zentrifugiert. Die Mikrosomen wurden in der gleichen Lösung und unter gleichen Bedingungen ein zweites Mal gewaschen und anschließend

in 250 ml einer 2 M Natriumjodid, 2,5 mM Na₂EDTA, 3 mM Magnesiumchlorid, 3 mM Na₂ATP, 5 mM Histidinhydrochlorid enthaltenden, mit Tris auf pH 7,3 eingestellten, Lösung suspendiert und bei 0° 30 Minuten langsam gerührt. Hierauf wurde mit eisgekühltem Wasser auf 0,8 M Natriumjodid verdünnt und bei 60000 g 50 Minuten zentrifugiert. Die resultierenden Mikrosomen wurden zweimal in 10 mM Tris-HCL-Puffer, pH 7,3, gewaschen, jeweils bei 60000 g 50 Minuten abzentrifugiert und in einer Lösung von 0,25 M Saccharose, 5 mM Histidinhydrochlorid und 1 mM EDTA, mit Tris auf pH 7,0 eingestellt, suspendiert, so daß das endgültige Volumen 250 ml betrug. Die Mikrosomensuspension wurde in Ampullen abgefüllt und bei -20° aufbewahrt.

2.2. Eiweißbestimmung der Mikrosomensuspension

Die Eiweißbestimmung wurde nach LOWRY et al. (1951) durchgeführt, wobei Labtrol als Standard diente. Sie ergab 420 µg Protein/ml der oben beschriebenen Mikrosomensuspension.

2.3. Bestimmung der ATPase-Aktivität

Die Bestimmung der ATPase-Aktivität wurde mit 42 µg Protein in einem Gesamtvolumen von 2,0 ml durchgeführt,

das 3 mM Adenosintriphosphat, 3 mM Magnesiumchlorid, 30 mM Tris, mit Salzsäure auf pH 7,5 eingestellt, enthielt, mit oder ohne Zusatz von 100 mM Natriumchlorid und 15 mM Kaliumchlorid. Die Inkubation wurde durch Substratzugabe gestartet, dauerte 15 Minuten bei 37° und wurde durch Zusatz von 1,0 ml 1,5 n Perchlorsäure und Einstellen in Eiswasser beendet. Die Eiskühlung der Proben erfolgte weiter bei der Probenahme bis zum Zusatz der Phosphatreagentien, da unter dieser Bedingung in dem durch die Perchlorsäure geschaffenen, stark sauren Medium die Zersetzung des Adenosintriphosphates sehr gering ist. Unter diesen Bedingungen spaltete in 2 Stunden ca. 1 % des vorgegebenen ATP ein Orthophosphat ab. Die Phenothiazin- und Iminodibenzylderivate wurden in 0,01 n Salzsäure gelöst hinzugefügt, wobei diese Salzsäure bei der Pufferbereitung berücksichtigt wurde.

2.4. Phosphatbestimmung

Die Phosphatbestimmung erfolgte nach Entfernung des Proteins und der Hemmstoffe und wurde nach der etwas modifizierten Methode von LOHMANN und LANGEN (1956) durchgeführt, die an die Methode von FISKE und SUBAROW (1925) anlehnt. Als Reduktionsmittel diente 2,4-Diamino-1-phenoldihydrochlorid.

Im Gegensatz zur Ausführung von DAVIS und BRODY (1966), die auch nach der Methode von FISKE und SUBARROW (1925) arbeiteten, mußten die Phenothiazin- und Iminodibenzyllderivate vor Zusatz der Molybdatlösung entfernt werden, da sich sonst ein Niederschlag bildet, der die Bestimmung beeinträchtigt. Dies wurde auch bei Eiskühlung der Proben ausreichend durch Ausschüttelung mit 1,0 ml Chloroform erreicht. Die Abtrennung des Proteins und Trennung der Emulsion erfolgte durch Zentrifugation bei 0° bei 1000 g 10 Minuten lang. Die für die Phosphatbestimmung verwendete Probenmenge betrug 0,5 ml. Die Messung des Farbkomplexes erfolgte in einem Eppendorf-Photometer 1101 M, bei einer Wellenlänge von 691 mμ und einer Schichtdicke von 10 mm.

3. E R G E B N I S S E

3.1. Aktivität der Adenosintriphosphatase

Die Aktivität der ATPase in der hergestellten Mikro-somenfraktion wurde durch Messung des aus ATP freigesetzten Orthophosphates bestimmt.

Die Na-K-ATPase-Aktivität wurde bestimmt als Differenz zwischen der Gesamtaktivität in Gegenwart von Na^+ , K^+ und Mg^{++} (100 mM, 15 mM und 3 mM) und der Aktivität ohne Na^+ und K^+ mit Mg^{++} (3 mM) allein. Die Na^+ - K^+ -Aktivität der ATPase betrug $42,5 \pm 9,2 \mu\text{M P}_i/\text{mg Protein}/15 \text{ Minuten}$, die Mg^{++} -Aktivität $2,04 \pm 0,22 \mu\text{M P}_i/\text{mg Protein}/15 \text{ Minuten}$ (Mittelwert von je 10 Bestimmungen $\pm$ Standardabweichung). Somit ergibt sich ein Verhältnis der Na^+ - K^+ -Aktivität zur Mg^{++} -Aktivität von annähernd 20 : 1.

3.2. Aktivität der Na-K-ATPase in Abhängigkeit von der Inkubationszeit

Wie aus Abb. 1 ersichtlich ist, zeigt die Untersuchung der Abhängigkeit der ATP-Spaltung von der Dauer der Inkubation in der Zeitspanne von 0 bis 30 Minuten einen linearen Verlauf. Für die nachstehenden Bestimmungen wurde so eine Inkubationsdauer von 15 Minuten festgelegt.

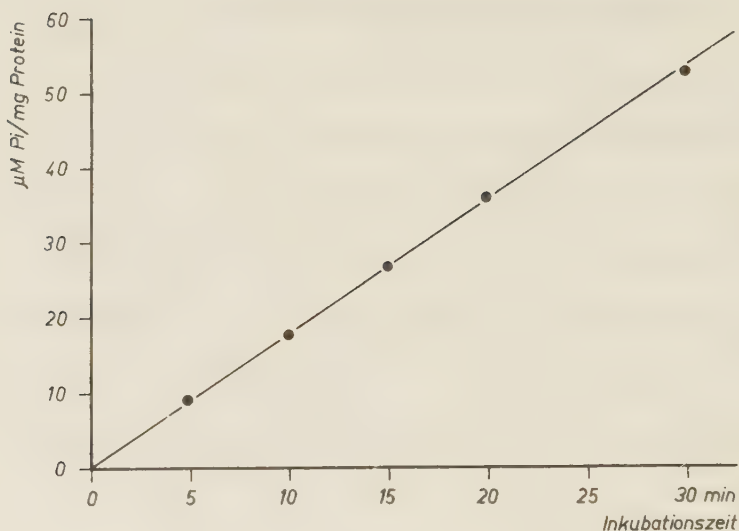


Abb. 1: Na-K-ATPase-Aktivität als Funktion der Inkubationszeit.

Abhängigkeit des freigesetzten Orthophosphates (in $\mu\text{M/mg Protein}$, O r d i n a t e) von der Inkubationsdauer (in Minuten, A b s z i s s e). Die Inkubationsdauer betrug 0 bis 30 Minuten. Die einzelnen Punkte stellen den Mittelwert von je drei Bestimmungen dar. Inkubationsmedium: 100 mM NaCl, 15 mM KCl, 3 mM MgCl_2 , 3 mM ATP, 30 mM Tris, mit HCL auf pH 7,5 eingestellt. Bestimmung mit bzw. ohne NaCl und KCl.

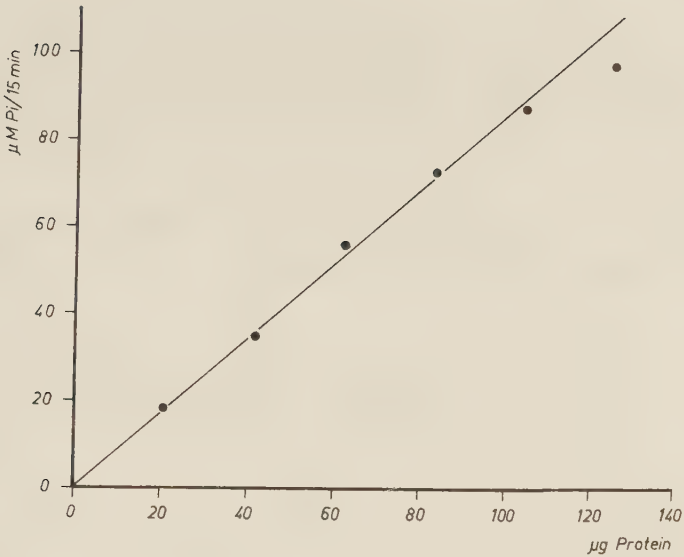


Abb. 2: Na-K-ATPase-Aktivität in Relation zur Proteinkonzentration.

Abhängigkeit des freigesetzten Orthophosphates (in $\mu\text{M}/15$ Minuten, O r d i n a t e) von der Proteinkonzentration (in μg Protein/ $2,0$ ml, A b s z i s s e). Die Proteinkonzentration betrug 21 bis $126 \mu\text{g}$ Protein in $2,0$ ml Inkubationsmedium. Die einzelnen Punkte stellen den Mittelwert von je drei Bestimmungen dar. Inkubationsmedium wie Abb. 1.

3.3. Aktivität der Na-K-ATPase in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration

Wie in Abb. 2 dargestellt, zeigte sich im Bereich von 0 bis 100 μg Protein in 2,0 ml Inkubationsmedium eine direkt proportionale Abhängigkeit der Aktivität der Na-K-ATPase von der Proteinkonzentration. Die nachstehenden Bestimmungen wurden mit 42 μg Protein in 2,0 ml Inkubationsmedium durchgeführt.

3.4. Bestimmung der Hemmung der Na-K-ATPase durch Chlorpromazin, Promazin, Imipramin und deren Monodesmethylderivate

DAVIS und BRODY (1966) untersuchten die Hemmung der Na-K-ATPase durch Chlorpromazin, Promazin und Imipramin nur für zwei Hemmstoffkonzentrationen und zwar 10^{-4} M und $5 \cdot 10^{-5}$ M, bei denen die Hemmung von Promazin und Imipramin sehr gering ist.

In Abb. 3 ist die Hemmung der Na-K-ATPase durch die untersuchten Psychopharmaka für je sechs Hemmstoffkonzentrationen dargestellt, die so gewählt wurden, daß Dosiswirkungskurven gezeichnet werden konnten. Die in Gegenwart von Hemmstoff freigesetzte Phosphatmenge wurde auf die Kontrollaktivität des jeweiligen Versuches bezogen und in % Hemmung der Na-K-ATPase

ausgedrückt. Für jeden Punkt der Darstellung wurden drei Bestimmungen durchgeführt. Hierbei wurden alle Versuche einer Kurve gleichzeitig angesetzt, um die Streuung zwischen den Versuchen zu eliminieren, damit der Verlauf der Dosiswirkungskurven besser charakterisiert werden konnte.

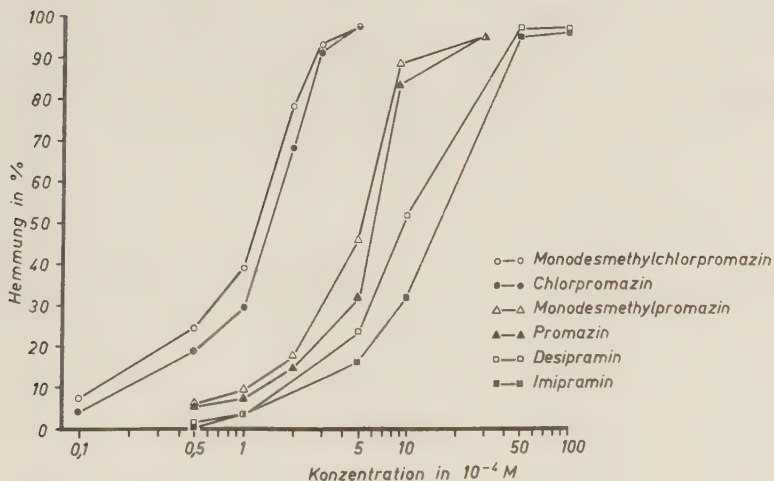


Abb. 3: Hemmung der Na-K-ATPase durch Chlorpromazin, Promazin, Imipramin und deren Monodesmethyl-derivate.

Abhängigkeit der Hemmung (in %, O r d i n a t e) von der Konzentration der Pharmaka (in M, A b s z i s s e). Die Inkubationsdauer betrug 15 Minuten. Die einzelnen Punkte stellen Mittelwerte von je drei Bestimmungen dar, wobei alle Versuche einer Kurve gleichzeitig angesetzt wurden. Inkubationsmedium wie Abb. 1.

Bei diesen Untersuchungen ergab sich für eine gleiche Hemmung folgende Reihenfolge der steigenden Hemmstoffkonzentrationen: Monodesmethylchlorpromazin, Chlorpromazin, Monodesmethylpromazin, Promazin, Desipramin und Imipramin. DAVIS und BRODY (1966) fanden hingegen die Anordnung: Chlorpromazin, Imipramin und Promazin. Dies ist wahrscheinlich auf die geringe Hemmung bei den von den Autoren verwendeten Konzentrationen von 10^{-4} M und $5 \cdot 10^{-5}$ M, bei denen sie die Hemmung dieser Substanzen verglichen haben, zurückzuführen.

Tab. 2: Vergleich der prozentualen Hemmung der Na-K-ATPase eigener Versuche mit Ergebnissen von DAVIS und BRODY (1966).

	% Hemmung der Na-K-ATPase			
	1×10^{-4} M		5×10^{-5} M	
	eigene Versuche	DAVIS u. BRODY	eigene Versuche	DAVIS u. BRODY
Chlorpromazin	29,5	38,0	18,8	17,0
Promazin	7,2	6,4	5,2	1,0
Imipramin	3,2	9,3	0	6,7

3.5. Statistische Sicherung der Unterschiede in der Hemmung zwischen Ausgangssubstanz und der Monodesmethylverbindung

Um die in Abb. 3 dargestellten, geringen Unterschiede der Hemmung zwischen Ausgangssubstanz und dem Monodesmethylderivat statistisch zu sichern, wurden von jeder Kurve im Bereich des steilsten Anstieges drei Konzentrationen gewählt, bei denen je fünf Versuche pro Meßpunkt durchgeführt wurden (Tab. 3 - 5). Für die zu vergleichenden Substanzen wurden alle Versuche gleichzeitig angesetzt. Die Inkubationszeit betrug jeweils 15 Minuten. Entsprechend dem Versuchsaufbau erfolgte die statistische Auswertung mit Hilfe von zweifachen Varianzanalysen (1. Einflußgröße: die zu vergleichenden Substanzen; 2. Einflußgröße: Konzentrationen dieser Substanzen). Zur varianzanalytischen Auswertung wurden nicht die prozentualen Hemmungen, sondern die gefundenen Phosphatmengen zugrundegelegt. Für alle verglichenen Substanzpaare: Monodesmethylchlorpromazin/Chlorpromazin, Monodesmethylpromazin/Promazin und Desipramin/Imipramin ergaben sich signifikante Unterschiede ($P < 0,01$); wobei alle Monodesmethylderivate die Na-K-ATPase stärker als die Ausgangssubstanzen hemmten (Tab. 3 - 5). Während bei dem Vergleich Chlorpromazin und Monodesmethylchlorpromazin keine Wechselwirkung

Tab. 3: Vergleich der Na-K-ATPase-Hemmung von Chlorpromazin und Monodesmethyl-chlorpromazin bei verschiedenen Hemmstoffkonzentrationen.

Inkubationsmedium wie Abb. 1, Versuchsanordnung siehe Text.

A. Einzelwerte:

Substanz	molare Konzentration	$\mu\text{M P}_i/\text{mg Protein}/15 \text{ min.}$	$\bar{x}$	s_x
Chlorpromazin	10^{-4}	24,35 25,79 24,79 28,45 26,15	25,90	1,59
	$2 \cdot 10^{-4}$	19,05 16,68 19,96 20,75 19,42	19,17	1,53
	$3 \cdot 10^{-4}$	11,67 10,30 14,58 13,13 14,50	12,83	1,84
Monodesmethyl-chlorpromazin	10^{-4}	22,90 23,98 24,35 24,90 25,90	24,40	1,10
	$2 \cdot 10^{-4}$	15,78 15,88 11,03 17,05 17,05	15,35	2,49
	$3 \cdot 10^{-4}$	9,48 9,04 11,22 10,30 10,30	10,06	0,84

B. Varianzanalytische Auswertung:

Beteiligte Einflußgrößen	Anzahl der Freiheitsgrade	Summe der Abw. Quadrate	Mittleres Abw. Quadrat	F	Signifikanz
Pharmaka	1	544322,6	544322,6	19,8	$P < 0,01$
Konzentrationen	2	9461948,8	4730974,4	172	$P < 0,01$
Wechselwirkung Pharmak./Konz.	2	67137,8	33568,9	1,22	n.s.
Wiederholungen	24	659705,9	27487,7		
Total	29	10733115,3			

Tab. 4: Vergleich der Na-K-ATPase-Hemmung von Promazin und Monodesmethylpromazin bei verschiedenen Hemmstoffkonzentrationen.
Inkubationsmedium wie Abb. 1, Versuchsanordnung siehe Text.

A. Einzelwerte:

Substanz	molare Konzentration	$\mu\text{M P}_i/\text{mg Protein}/15 \text{ min.}$	$\bar{x}$	s_x
Promazin	$2 \cdot 10^{-4}$	34,85 35,75 36,38 34,50	35,34	0,74
	$5 \cdot 10^{-4}$	25,73 25,98 26,82 26,75	26,14	0,61
	$9 \cdot 10^{-4}$	5,84 5,75 5,75 5,57	5,63	0,22
Monodesmethylpromazin	$2 \cdot 10^{-4}$	33,95 33,58 33,82 33,95	33,73	0,24
	$5 \cdot 10^{-4}$	20,80 20,80 20,90 21,16	20,98	0,20
	$9 \cdot 10^{-4}$	4,02 3,83 3,83 4,11	3,92	0,13

B. Variationsanalytische Auswertung:

Beteiligte Einflußgrößen	Anzahl der Freiheitsgrade	Summe der Abw. Quadrate	Mittleres Abw. Quadrat	F	Signifikanz
Pharmaka	1	599253,3	599253,3	327	$P \ll 0,01$
Konzentrationen	2	45293009,2	22646404,6	12000	$P \ll 0,01$
Wechselwirkung Pharmak./Konz.	2	205024,0	102512,0	55,9	$P \ll 0,01$
Wiederholungen	24	44020,8	1834,2		
Total	29	46141307,4			

Tab. 5: Vergleich der Na-K-ATPase-Hemmung von Imipramin und Desipramin bei verschiedenen Hemmstoffkonzentrationen.

Inkubationsmedium wie Abb. 1, Versuchsanordnung siehe Text.

A. Einzelwerte:

Substanz	molare Konzentr.	$\mu\text{M P}_i/\text{mg Protein}/15 \text{ min.}$	$\bar{x}$	s_x
Imipramin	$5 \cdot 10^{-4}$	39,80 41,10 39,70 40,40 40,20	40,24	0,55
	10^{-3}	28,90 31,20 32,10 31,10 28,62	30,44	1,57
	$3 \cdot 10^{-3}$	2,92 3,56 4,11 4,65 2,74	3,59	0,80
Desipramin	$5 \cdot 10^{-4}$	36,88 37,98 37,01 37,80 36,30	37,19	0,69
	10^{-3}	20,05 25,55 23,90 24,35 19,97	22,76	2,58
	$3 \cdot 10^{-3}$	0,64 1,28 1,28 1,10 0,64	0,98	0,32

B. Varianzanalytische Auswertung:

Beteiligte Einflußgrößen	Anzahl der Freiheitsgrade	Summe der Abw. Quadrate	Mittleres Abw. Quadrat	F	Signifikanz
Pharmaka	1	1481629,6	1481629,6	83	$P < 0,01$
Konzentrationen	2	68819291,2	34409645,6	1928	$P < 0,01$
Wechselwirkung Pharmak./Konz.	2	394924,8	197462,4	11,1	$P < 0,01$
Wiederholungen	24	428387,6	17849,4		
Total	29	71124233,3			

zwischen Substanzen und Konzentrationen nachweisbar war, was einem parallelen Verlauf der Dosiswirkungskurven entspricht, ergab sich für Promazin/Monodesmethylpromazin und Imipramin/Desipramin jeweils eine signifikante Wechselwirkung (keine Parallelität der Dosiswirkungskurven).

3.6. Hemmung der Na-K-ATPase durch die Monodesmethyl-
derivate von Chlorpromazin, Promazin und Imipra-
min im Vergleich zu den Ausgangssubstanzen bei
verschiedenen Kaliumkonzentrationen

In Anlehnung an Arbeiten von JUDAH und AHMED (1964), die die Na-K-ATPase-Hemmung durch Chlorpromazin und Promethazin in Abhängigkeit von der Kaliumkonzentration untersucht hatten, wurde die Hemmung der Na-K-ATPase durch die Ausgangssubstanzen mit der Hemmung der Monodesmethyl-derivate im doppeltreziproken System nach LINEWEAVER und BURK verglichen.

Hierzu wurde die Hemmung der Na-K-ATPase durch Chlorpromazin, Promazin, Imipramin und deren Monodesmethyl-derivate bei vier verschiedenen Kaliumkonzentrationen (1,0, 1,5, 2,5, 5,5 mM KCl) bestimmt, wobei die Natrium-, Magnesium- und ATP-Konzentration (100 mM NaCl, 3 mM $MgCl_2$ und 3 mM ATP) konstant gehalten und auf pH 7,5 eingestellt wurde. Die Bestimmung der Aktivität wurde

mit bzw. ohne Hemmstoff durchgeführt, wobei die Magnesiumaktivität, ohne NaCl und ohne KCl, gleichfalls mit bzw. ohne Hemmstoff bestimmt und von der Gesamtaktivität abgezogen wurde. Die Inkubationsdauer betrug 15 Minuten.

Die Hemmung der einzelnen Substanzen wurde für je zwei Konzentrationen bestimmt, wobei die Konzentration von Chlorpromazin und Monodesmethylchlorpromazin 10^{-4} M und 2×10^{-4} M, Promazin 5×10^{-4} M und 7×10^{-4} M, Monodesmethylpromazin 3×10^{-4} M und 5×10^{-4} M, Imipramin und Desipramin 5×10^{-4} M und 10^{-3} M in der Inkubationslösung betrug. Diese Bestimmungen wurden mit der gleichen Präparation der Na-K-ATPase durchgeführt wie die Bestimmung der prozentualen Hemmung der Na-K-ATPase.

Obwohl die Hemmung der Mg^{++} -abhängigen Aktivität der ATPase durch die Phenothiazin- und Iminodibenzyl-derivate gering ist, wurde dennoch zwecks einer genaueren Bestimmung bei diesen Versuchen die Hemmung der Mg^{++} -Aktivität für jede Konzentration der angewandten Hemmstoffe bestimmt und von der gehemmten Gesamtaktivität mit Mg^{++} , Na^{+} und K^{+} abgezogen, so daß die Differenz die Na^{+} - K^{+} -Aktivität darstellt.

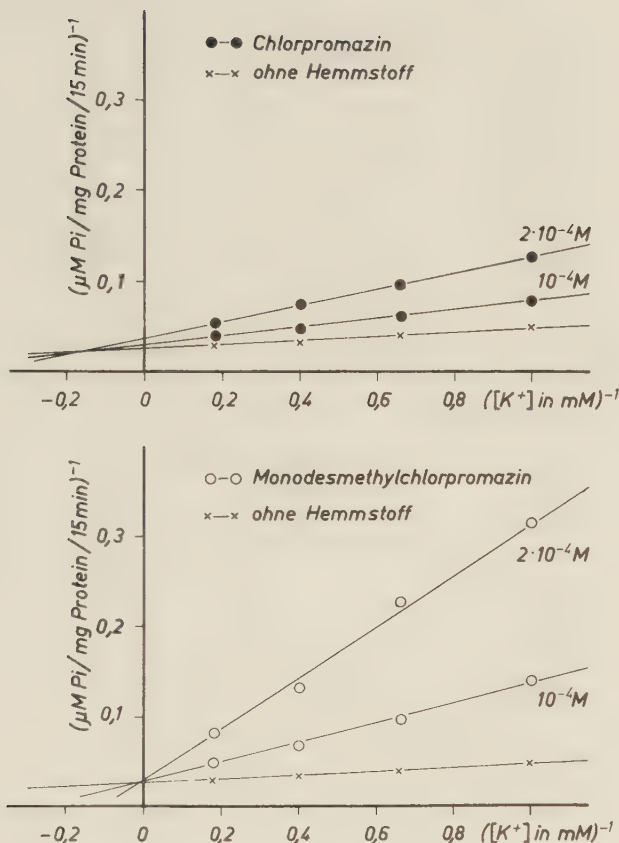


Abb. 4: Einfluß von Chlorpromazin und Monodesmethylchlorpromazin auf die K^+ -Aktivierung der Na-ATPase.

Darstellung im doppeltreziproken System nach LINEWEAVER-BURK, in der die reziproke Reaktionsgeschwindigkeit (O r d i n a t e) gegen die reziproke Kaliumkonzentration (A b s z i s s e) aufgetragen ist. Versuchsbedingungen und -anordnung siehe Text (S.21). Die einzelnen Punkte stellen Mittelwerte von je drei Bestimmungen dar. Die Versuche für eine Substanz wurden gleichzeitig durchgeführt.

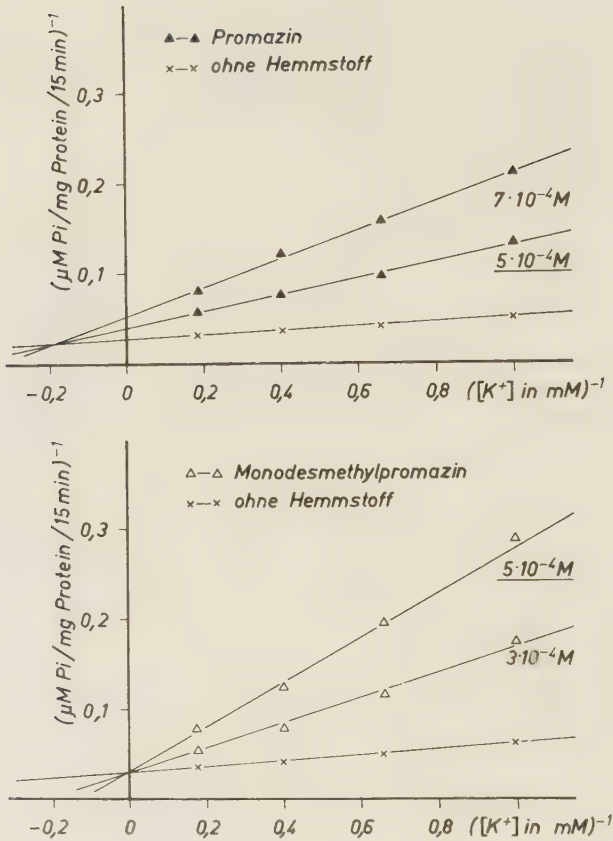


Abb. 5: Einfluß von Promazin und Monodesmethylpromazin auf die K^+ -Aktivierung der Na-K-ATPase.

Darstellung im doppeltreziproken System nach LINEWEAVER-BURK, in der die reziproke Reaktionsgeschwindigkeit (O r d i n a t e) gegen die reziproke Kaliumkonzentration (A b s z i s s e) aufgetragen ist. Versuchsbedingungen und -anordnung siehe Text (S.21). Die einzelnen Punkte stellen Mittelwerte von je drei Bestimmungen dar. Die Versuche für eine Substanz wurden gleichzeitig durchgeführt.

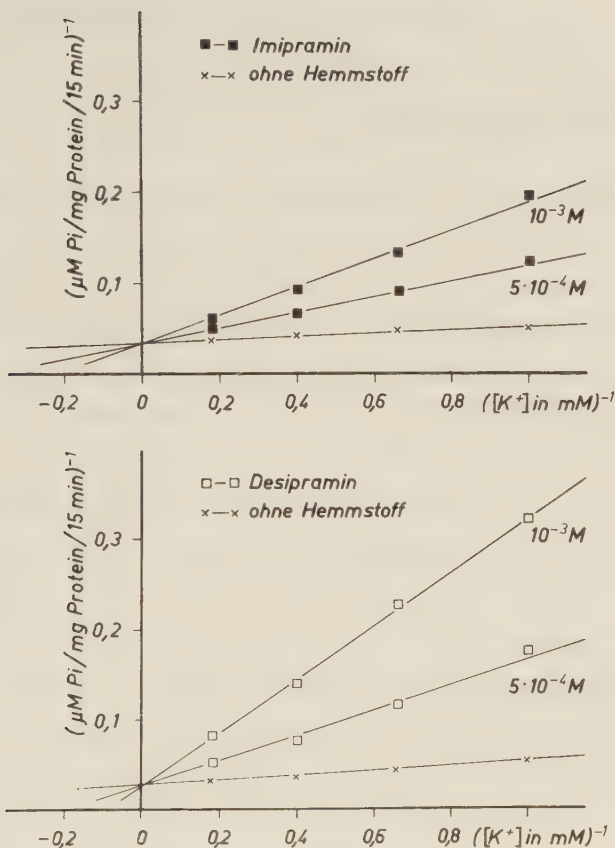


Abb. 6: Einfluß von Imipramin und Desipramin auf die K^+ -Aktivierung der Na-K-ATPase.

Darstellung im doppeltreziproken System nach LINEWEAVER-BURK, in der die reziproke Reaktionsgeschwindigkeit (*O r d i n a t e*) gegen die reziproke Kaliumkonzentration (*A b s z i s s e*) aufgetragen ist. Versuchsbedingungen und -anordnung siehe Text (S.21). Die einzelnen Punkte stellen Mittelwerte von je drei Bestimmungen dar. Die Versuche für eine Substanz wurden gleichzeitig durchgeführt.

4. D I S K U S S I O N

4.1. Hemmung der Na-K-ATPase

Bei der Untersuchung der Hemmung der Na-K-ATPase fanden DAVIS und BRODY (1966) für eine 10^{-4} M bzw. $5 \cdot 10^{-4}$ M Hemmstoff enthaltende Lösung eine Zunahme der Hemmung in folgender Reihenfolge (Tab. 2): Promazin, Imipramin, Chlorpromazin, die nicht voll bestätigt werden konnte. Wie aus Abb. 3 und Tab. 2 zu ersehen ist, nimmt die Hemmung der Na-K-ATPase nach unseren Untersuchungen für eine bestimmte Konzentration in folgender Reihenfolge zu (bzw. die Konzentration für eine gleich große Hemmung in folgender Reihenfolge ab): Imipramin, Promazin, Chlorpromazin.

Aufgrund von Arbeiten von SCHOLTAN (1964) erwarteten KRIEGLSTEIN (1970) und GLASSER und KRIEGLSTEIN (1970) nach Demethylierung der Dimethylaminopropyl-Seitenkette in Stellung 10 von Chlorpromazin und Promazin, bzw. in Stellung 5 bei Imipramin eine deutliche Abnahme der Eiweißbindung; wie auch der Verteilungsquotient dieser Desmethylverbindungen zwischen n-Octanol und Pufferlösung um das Zehnfache gegenüber den Ausgangssubstanzen abnimmt. Bei der experimentellen Bestimmung der Eiweißbindung der Desmethylderivate stellen dieselben Autoren jedoch fest, daß diese kaum gegenüber der Eiweißbindung

der Ausgangssubstanzen verändert ist.

Wie in Tab. 1 dargestellt, besteht ein Zusammenhang zwischen der Eiweißbindung und der Hemmung der Na-K-ATPase durch diese Psychopharmaka, indem bei den einzelnen Substanzen mit zunehmender Eiweißbindung auch die durch diese Psychopharmaka bewirkte Hemmung der Na-K-ATPase zunimmt.

Hierbei scheint der Struktur der Seitenkette im Hinblick darauf, daß die Na-K-ATPase einen hypothetischen Wirkort darstellen könnte, eine besondere Bedeutung zuzukommen. Die Monodesmethylderivate zeigen eine kaum veränderte, experimentell bestimmte Eiweißbindung und eine stärkere Hemmung der Na-K-ATPase im Vergleich mit den Ausgangssubstanzen. Hinzu kommt, daß die Hemmung der Na-K-ATPase mit sinkender Kaliumkonzentration steigt und dieses Verhalten bei den Monodesmethylderivaten deutlich verstärkt ist (vgl. Abb. 4 - 6 und Tab. 7). Dabei kommt eine stärkere ionogene Bindung der Monodesmethylderivate durch die Seitenkette in Betracht, da diese einen höheren pK_a aufweisen.

Die verstärkte Hemmung der Na-K-ATPase durch die Monodesmethylderivate bei abnehmender Kaliumkonzentration kommt in den Darstellungen nach LINEWEAVER-BURK (1934) im steileren Anstieg der Geraden der Monodesmethylderivate und in den graphisch ermittelten Hemmkonstanten zum Ausdruck (Tab. 6).

Die Tatsache, daß die Hemmung der Na-K-ATPase mit sinkender Kaliumkonzentration zunimmt, läßt an einen Antagonismus zwischen Kalium und den Phenothiazin- bzw. Iminodibenzylderivaten denken, da der kaliumabhängige Schritt der ATP-Spaltung, d.h. die Abspaltung des Orthophosphates vom phosphorylierten Enzym, gehemmt wird. AKERA und BRODY (1968, 1969, 1970) nehmen an, daß die Phenothiazine, speziell Chlorpromazin, über ein freies Radikal, das durch Elektronenabgabe am Schwefelatom entsteht, die Na-K-ATPase hemmen und so ihre Wirkung entfalten.

Tab. 6: Hemmkonstanten der Na-K-ATPase-Hemmung durch Chlorpromazin, Promazin, Imipramin und deren Monodesmethylderivate aus LINEWEAVER-BURK-Darstellungen (Abb. 4 - 6) graphisch ermittelt.

Hemmstoffkonzentration		$\frac{10^{-4}M}{}$	$\frac{2 \cdot 10^{-4}M}{}$
Chlorpromazin		$1,72 \cdot 10^{-3}$	$2,50 \cdot 10^{-3}$
Monodesmethyl-Chlorpromazin		$5,20 \cdot 10^{-3}$	$12,0 \cdot 10^{-3}$
Hemmstoffkonzentration	$\frac{3 \cdot 10^{-4}M}{}$	$\frac{5 \cdot 10^{-4}M}{}$	$\frac{7 \cdot 10^{-4}M}{}$
Promazin		$2,22 \cdot 10^{-3}$	$3,12 \cdot 10^{-3}$
Monodesmethyl-Promazin	$4,77 \cdot 10^{-3}$	$8,60 \cdot 10^{-3}$	
Hemmstoffkonzentration		$\frac{10^{-3}M}{}$	$\frac{5 \cdot 10^{-4}M}{}$
Imipramin		$5,17 \cdot 10^{-3}$	$3,06 \cdot 10^{-3}$
Desipramin		$11,55 \cdot 10^{-3}$	$5,17 \cdot 10^{-3}$

BLOOR et al. (1970) berichten, daß zur Ausbildung der elektronenabgebenden Eigenschaften, die zur Radikalbildung bei den Phenothiazinen führen, eines der Heteroatome ein Stickstoff sein muß, um das Molekül zu einem mäßig guten Elektronendonator zu machen. Weiter stellen die Autoren fest, daß P h e n o x a z i n e wenig bessere Elektronendonatoren als die P h e n o t h i a z i n e sind, jedoch mit ihren S-Analogen verglichen sehr geringe pharmakologische Wirkung zeigen, so daß keine einfache Beziehung zwischen elektronenabgebenden Eigenschaften und der psychopharmakologischen Wirkung bestehen kann.

Wesentlich für die Frage der Bildung eines Radikals ist die Feststellung, daß die Dimethylaminopropylseitenkette u. a. bei Promazin die Elektronendonatoreigenschaften zwar verstärkt, jedoch bei Protonierung der Dimethylaminogruppe ein starker Abfall der Elektronendonatoreigenschaften festzustellen ist, was auch für Chlorpromazin nachgewiesen wurde. In vivo und auch bei den Hemmversuchen der Na-K-ATPase in vitro bei einem pH 7,5 ist mit einer Protonierung der Dimethylaminogruppe zu rechnen und damit die Bereitschaft zur Radikalbildung sehr gering.

AKERA und BRODY (1969), die die Chlorpromazin-Hemmung der Na-K-ATPase auf die Bildung von freien Radikalen zurückführen, beobachteten auch einen extrem schnellen

Abfall der Radikalkonzentration (Bildung durch UV-Be-
strahlung) bei pH 7,5 und führen die Versuche in diesem
Fall bei pH 5,8 durch.

AKERA und BRODY (1968) gehen u.a. davon aus, daß eine
Metabolisierung der Phenothiazine zu Sulfoxyverbindun-
gen eine Radikalbildung voraussetzt und so diese Sulf-
oxymetaboliten als Beweis für die Radikalwirkung anzu-
nehmen sind.

Neben der geringen Bereitschaft zur Radikalbildung, die
BLOOR et al. (1970) nachgewiesen haben, zeigen neuere
Untersuchungen, daß die Demethylierung zu Monodesmethyl-
verbindungen, und nicht - wie meist angenommen worden
war - die Sulfoxylierung oder Hydroxylierung, den wich-
tigsten metabolischen Weg darstellt (ROBINSON 1966,
BICKEL et al. 1967, KRIEGLSTEIN 1970).

Wesentlich erscheint hier die Beobachtung, daß die Mono-
desmethylverbindungen, verglichen mit den die Dimethyl-
aminogruppe tragenden Analogen, eine gleich große, even-
tuell stärkere Eiweißbindung aufweisen (GLASSER u.

KRIEGLSTEIN 1970) und gleichfalls die Na-K-ATPase stär-
ker hemmen. Aufgrund des höheren pK_a werden die Sub-
stanzen mit der Monomethylaminogruppe leichter proto-
niert, was auch zu einer geringen Bereitschaft zur Radi-
kalbildung führt. Wie nachgewiesen wurde, zeigen aber
gerade die Monodesmethylmetaboliten von Chlorpromazin,
Promazin und Imipramin, die stärkere Basen darstellen,

Tab. 7: Abhängigkeit der Na-K-ATPase-Hemmung von der Kaliumkonzentration in % der ungehemmten Reaktion.

Versuchsbedingungen und -anordnung siehe Text (S. 21).

Hemmstoff	Hemmstoff- Konzentr. in M	% Hemmung bei Kalium - Konzentration in mM	Hemmstoff- Konzentr. in M	% Hemmung bei Kalium - Konzentration in mM
		1,0 1,5 2,5 5,5		1,0 1,5 2,5 5,5
Chlorpromazin	1×10^{-4}	35,5 32,1 27,3 23,6	2×10^{-4}	60,4 58,2 54,8 45,3
Monodesmethyl- chlorpromazin	1×10^{-4}	65,5 58,6 51,2 39,7	2×10^{-4}	84,7 82,5 74,8 64,8
Promazin	5×10^{-4}	61,7 55,8 52,2 40,4	7×10^{-4}	76,5 73,1 70,6 58,3
Monodesmethyl- promazin	5×10^{-4}	78,4 74,2 65,9 53,8	3×10^{-4}	64,2 56,7 45,9 32,1
Imipramin	5×10^{-4}	51,6 45,3 34,7 24,7	1×10^{-3}	69,2 62,8 52,8 40,0
Desipramin	5×10^{-4}	69,8 61,5 51,3 38,2	1×10^{-3}	83,7 80,9 73,7 59,4

eine stärkere Hemmung der Na-K-ATPase, wobei Desipramin in diesem Sinne zu einer Radikalbildung nicht befähigt ist.

JUDAH und AHMED (1964) zeigten an Rattenleberschnitten, deren Kaliumaufnahme und Natriumabgabe im Verhältnis 1 : 1 McLEAN (1963) näher untersucht hatte, daß die Kaliumaufnahme unter anderem durch Chlorpromazin und Promethazin gehemmt wird und daß diese Hemmung der Kaliumkonzentration im Medium umgekehrt proportional ist.

Gegenüber der Natriumkonzentration verhält sich die Hemmung der Kaliumaufnahme umgekehrt. Die Autoren stellen weiter fest, daß die Hemmung der Kaliumaufnahme durch die Leberschnitte mit der Hemmung der aus Rattenleber und -hirn dargestellten Na-K-ATPase übereinstimmt.

AKERA und BRODY (1968) bestätigen zunächst die Ergebnisse von JUDAH und AHMED (1964), daß durch Chlorpromazin bei niedrigen Kaliumkonzentrationen eine stärkere Hemmung der Na-K-ATPase erfolgt (vgl. Tab. 7 und Abb. 4 - 6), später widerrufen die Autoren (AKERA u. BRODY, 1969) dies und stellen an Hand neuerer Untersuchungen fest, daß die "Chlorpromazin-Radikale" die Na-K-ATPase bei k l e i n e n Kaliumkonzentrationen g e r i n g e r hemmen, woraus sie folgern, daß durch diese Radikale der erste, natriumabhängige, Schritt (vgl. S. 4: Reaktion 1) der ATP-Spaltung gehemmt wird.

AKERA und BRODY (1969) stellen die zu dieser Schlußfolgerung führenden Ergebnisse der kaliumabhängigen Hemmung der Na-K-ATPase durch die Chlorpromazin-Radikale im doppeltreziproken System nach LINEWEAVER-BURK und in einem HUNTER-DOWNS-Diagramm dar, wobei die zweite Darstellungsweise mit der Arbeit von HUNTER und DOWNS (1945) nicht übereinstimmt. Bei Überprüfung der dargestellten Ergebnisse von AKERA und BRODY (1969) ergibt sich jedoch aus dem LINEWEAVER-BURK-Diagramm, daß auch die Chlorpromazin-Radikale die Na-K-ATPase bei niedrigen Kaliumkonzentrationen stärker hemmen, was mit den Ergebnissen von JUDAH und AHMED (1964) und den im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Resultaten übereinstimmt.

4.2. Gegenüberstellung der Hemmung der Na-K-ATPase durch trizyklische Psychopharmaka und durch Herzglykoside

Die Na-K-ATPase wird u.a. auch durch herzwirksame Glykoside gehemmt, indem gleichfalls der kaliumabhängige Schritt gehemmt wird (CHARNOCK et al., 1963; GLYNN, 1964; ALBERS et al., 1968). Die Hemmung der Na-K-ATPase verhält sich bei den Herzglykosiden der Anzahl der Hydroxylgruppen und der Zuckerreste umgekehrt proportional (ALBERS et al., 1968), was mit anderen Untersuchungen übereinstimmt, die eine hydrophobe Bindung des

Steroidsystems der Herzglykoside feststellen. Die Carbonylgruppe des Lactonringes, deren Basizität durch die α - β -ständige Doppelbindung erhöht ist, geht gleichzeitig als Protonenakzeptor eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem phosphorylierten Enzym ein (PORTIUS u. REPKE, 1964). Durch die Einführung einer 1β - 19 -Isopropyliden-, 7β - und 16β -Hydroxy- sowie 19 -Carbonsäuregruppe in das Steroidgerüst verschiedener Herzglykoside konnte gezeigt werden, daß sich die Herzglykoside mit der β -Seite des Steroids an den Rezeptor anlagern und hier ihre hydrophobe Bindung eingehen. Bei Einführung der genannten Gruppen wird die Wirksamkeit der Herzglykoside stark reduziert und auch die Hemmung der Na-K-ATPase vermindert (PORTIUS u. REPKE, 1964).

Für den Wirkungsmechanismus der Herzglykoside gegenüber der Na-K-ATPase wurde nachgewiesen, daß diese das Enzym so verändern, daß es durch Orthophosphat bei Anwesenheit von Natrium phosphoryliert wird und diese Phosphorylierung mit der maximalen Phosphorylierung des unbehandelten Enzyms durch ATP (in Gegenwart von Natrium) vergleichbar ist (ALBERS et al., 1968). Ohne Herzglykoside kann das Enzym bei Abwesenheit von Natrium keine meßbaren Mengen von Orthophosphat aufnehmen (POST et al., 1965).

Die Bindung der Herzglykoside an die Na-K-ATPase erfolgt einerseits ohne Natrium in Gegenwart von Orthophosphat und Magnesium (Natrium hemmt diese Bindung in Gegenwart

von Mg und P_i) und andererseits in Gegenwart von Natrium, Magnesium und ATP (MATSUI u. SCHWARTZ, 1967; ALBERS, 1968; SCHWARTZ et al., 1968). Die zweite Bedingung für die Bindung der Herzglykoside an die Na-K-ATPase ist in vivo gegeben.

Die Bindung von H^3 -Digoxin an die Na-K-ATPase wird durch aktive Herzglykoside verdünnt; nicht jedoch durch inaktive Herzglykoside (MATSUI u. SCHWARTZ, 1967).

Die Bindung der Herzglykoside an das Enzym macht diese gegenüber Kalium relativ unempfindlich und hemmt so den kaliumabhängigen Schritt der Abspaltung des Orthophosphates, bei dem der Kaliumtransport in die Zelle erfolgt.

Die Bindung der untersuchten Phenothiazin- und Iminodibenzyllderivate an Albumin erfolgt durch die hydrophobe Bindung des Ringsystems und durch die ionogene Bindung des basischen Stickstoffs der Seitenkette (KRIEGLSTEIN, 1970; GLASSER u. KRIEGLSTEIN, 1970). Zwischen der Eiweißbindung und der Hemmung der Na-K-ATPase besteht eine Korrelation, so daß hier eine gleichartige Bindung an das Enzymprotein angenommen werden kann.

Die Bindung der Herzglykoside einerseits und der Phenothiazin- und Iminodibenzyllderivate andererseits an das Enzymprotein, das ein Lipoprotein darstellt (AHMED u. JUDAH, 1964 u. 1965; SKOU, 1965), stimmt insofern überein, als ein lipophiles Ringsystem hydrophobe Bindungen eingeht und gleichzeitig an diesem Ringsystem eine

Struktur vorliegt, die zu einer Wasserstoffbrückenbindung bzw. ionogenen Bindung befähigt ist.

Eine weitere Parallele zwischen den Herzglykosiden und den Phenothiazinen besteht darin, daß beide Substanzgruppen die Kaliumaufnahme von Leberschnitten hemmen und daß die Hemmung beider Substanzgruppen der Kaliumkonzentration im Medium umgekehrt proportional ist.

Diese Hemmung der Kaliumaufnahme von Leberschnitten ist der Hemmung der Na-K-ATPase streng korreliert (JUDAH u. AHMED, 1964). Im Gegensatz hierzu ist die Kaliumaufnahme der Leberschnitte bei niedriger Natriumkonzentration im Medium geringer und die Hemmung der Kaliumaufnahme durch Herzglykoside und Phenothiazine bei niedriger Natriumkonzentration deutlich vermindert (JUDAH u. AHMED, 1964).

Interessant ist in diesem Zusammenhang, daß die Ratte, deren Na-K-ATPase des Herzmuskels einen sehr instabilen Komplex mit den Herzglykosiden bildet (SCHWARTZ et al., 1969), nicht durch Schädigung des Herzens, sondern durch eine zentrale Wirkung - Lähmung des Atemzentrums - stirbt.

4.3. Bezugssystem der Wirkung der Phenothiazin- und Iminodibenzylderivate

Die Phenothiazine (Chlorpromazin) reichern sich einerseits in der Hirnrinde und im Hypothalamus an (GOUZON et al., 1954; SALZMAN u. BRODIE, 1956; HAUSCHILD, 1961).

Andererseits sind in der grauen Substanz auch die höchsten Na-K-ATPase-Aktivitäten festzustellen (BONTING et al., 1961), die eine Beziehung zu den cholinergen Nerven zeigen (ALBERS et al., 1965). Die Na-K-ATPase ist weiter in ihrem kaliumabhängigen Schritt durch Phenothiazin- und Iminodibenzyllderivate hemmbar (vgl. Tab. 6 und JUDAH u. AHMED, 1964), wobei in vivo durch Phenothiazine (Chlorpromazin) eine starke Zunahme des ATP-Gehaltes u.a. in der Hirnrinde und besonders auch im Thalamus und Hypothalamus nachweisbar ist (GRENELL et al., 1955). Diese Feststellungen machen es wahrscheinlich, daß die Phenothiazin- und Iminodibenzyllderivate ihren Wirkort an der Na-K-ATPase haben und dieser an der Zellmembran extrazellulär (vgl. ROBINSON, 1968) liegt. Dieser Gedanke wird weiter dadurch gestützt, daß die Phenothiazin- und Iminodibenzyllderivate in hohen Dosen im Organismus genauso wie die Herzglykoside zu Symptomen führen, die einer Hypokaliämie gleichen (EKG usw.) (KUSCHINSKY u. LÜLLMANN, 1970; LUDEWIG u. LOHS, 1968; MOESCHLIN, 1965; SCHWAB, 1970).

Die Beobachtung, daß bei der Untersuchung der Na-K-ATPase die optimale Konzentration von Natrium 100 - 120 mM und von Kalium 5 - 15 mM im Inkubationsmedium beträgt und damit sehr ähnlich der Ionenkonzentration in der extrazellulären Flüssigkeit ist und daß die Na-K-ATPase bei einem Ionenverhältnis, das dem intrazellulären Raum

(Na 10 mM und K 150 mM) entspricht, kaum eine Aktivität zeigt (vgl. SKOU, 1960 u. 1962), spricht dafür, daß die für den Ionentransport verantwortlich gemachte Na-K-ATPase an der Außenseite der Zellmembran ihre Wirkung entfalten muß.

Kinetische Untersuchungen der Na-K-ATPase an Erythrozyten von PRIESTLAND und WHITTAM (1968), die ROBINSON (1968) als eine heterotrope allosterische Wechselwirkung von Na^+ und K^+ interpretiert, zeigen, daß die K^+ -Seite der Na-K-ATPase an die extrazelluläre, hohe Na^+ -Konzentration gebunden ist.

Für Erythrozyten und Nervenzellen wurde weiter gezeigt, daß bei Fehlen von Kalium in der Außenflüssigkeit das Natrium langsamer aus den Zellen ausströmt (RAPOPORT, 1966; PRIESTLAND u. WHITTAM, 1968). Da die Natriumextrusion mit der Kaliumintrusion zumindest teilweise gekoppelt ist und dieser Teil des ersten Vorganges vom zweiten abhängt, liegt es nahe, daß bei Hemmung des kaliumabhängigen Schrittes intrazellulär die Kaliumkonzentration abnimmt und die Natriumkonzentration zunimmt. Ein Zustand, der in vivo einer Hypokaliämie gleicht und mit der auch immer eine Verarmung des Intrazellulärtraumes an Kalium einhergeht.

Dieser Zustand ist auch nach hohen Dosen von Herzglykosiden und bei Chlorpromazinintoxikation nachgewiesen (MOESCHLIN, 1965).

4.4. Wirkungsänderung der trizyklischen Psychopharmaka durch Umwandlung zu Monodesmethylderivaten

BICKEL et al. (1967) zeigten an einer Reihe trizyklischer Psychopharmaka, daß die höchste Demethylierungsrate der Monodesmethylverbindungen kleiner ist als die tiefste Demethylierungsrate der Verbindungen mit einer Dimethylaminogruppe, wodurch es zur Anreicherung der Monodesmethylverbindung kommt. Diese Verbindungen sind ebenfalls noch ausgeprägt lipophil, so daß sie durch die Niere nur in geringem Maße ausgeschieden werden und in vivo die Voraussetzungen für eine Kumulierung gegeben sind. So kann die Umwandlung eines Neuroleptikums in ein Thymoleptikum erfolgen, wie sie für Imipramin/Desipramin und Amitriptylin/Nortriptylin nachgewiesen wurde (BICKEL et al., 1967).

Im Gegensatz zu Imipramin zeigt Desipramin und auch Monodesmethylchlorpromazin und Monodesmethylpromazin gegenüber den Ausgangssubstanzen eine stärkere Hemmung des kaliumabhängigen Schrittes der ATP-Spaltung durch die Na-K-ATPase, so daß eine stärkere Bindung an das Enzymprotein angenommen werden muß und so ein Ansatz für die Frage der Wirkungsänderung gegeben ist, die u.a. auch bei Promazin und Triflupromazin (BICKEL et al., 1963) bekannt ist.

Die stärkere Hemmung der Na-K-ATPase durch die Monodesmethylderivate kommt bei der Darstellung der Dosiswir-

kungskurven (Abb. 3) als auch bei den aus den LINEWEAVER-BURK-Diagrammen (Abb. 4 - 6) ermittelten Hemmkonstanten (Tab. 6) zum Ausdruck.

Aus den LINEWEAVER-BURK-Diagrammen (Abb. 4 - 6) ist zu ersehen, daß alle Monodesmethyl-derivate auch bei abnehmender Kaliumkonzentration stärker hemmen und daß diese Hemmung kompetitiv ist. Darüber hinaus zeigt auch Imipramin kompetitive Hemmung, Chlorpromazin und Promazin hingegen eine gemischte Hemmung (NETTER, 1959).

Mit dieser Änderung des Hemmtyps bei den Monodesmethyl-derivaten von Chlorpromazin und Promazin gegenüber den Ausgangssubstanzen kann die Wirkungsänderung dieser Verbindungen bei der Metabolisierung zusammenhängen, zumal eine Umwandlung in Basen mit einem höheren pK_a erfolgt, deren Seitenkette mit dem Protein eine stärkere ionogene Bindung eingehen kann.

5. Z U S A M M E N F A S S U N G

Die Hemmung der Na-K-ATPase durch die Monodesmethylverbindungen von Chlorpromazin, Promazin und Imipramin im Vergleich zur Hemmung des Enzyms durch die Ausgangssubstanzen wurde an aus Rattenhirn isolierter Na-K-ATPase untersucht. Die Ergebnisse wurden in Dosiswirkungskurven und in LINEWEAVER-BURK-Diagrammen dargestellt.

Es konnte gezeigt werden, daß zwischen der Hemmung der Na-K-ATPase und der Eiweißbindung dieser Psychopharmaka ein Zusammenhang besteht und daß die Hemmung mit steigender Eiweißbindung zunimmt.

Die Hemmung der Na-K-ATPase durch die untersuchten trizyklischen Psychopharmaka steigt in folgender Reihenfolge: Imipramin, Desipramin, Promazin, Monodesmethylpromazin, Chlorpromazin, Monodesmethylchlorpromazin und nimmt mit abnehmender Kaliumkonzentration im Inkubationsmedium zu. Aus der zunehmenden Hemmung bei abnehmender Kaliumkonzentration wurde geschlossen, daß der kaliumabhängige Schritt der ATP-Spaltung durch die Na-K-ATPase von den hier untersuchten Substanzen gehemmt wird. Die stärkere Hemmung des Enzyms durch die Monodesmethylderivate im Vergleich zu den Dimethylamino-Ausgangssubstanzen wurde durch eine doppelte Varianzanalyse statistisch gesichert.

Die stärkere Hemmung kommt gleichfalls in den Hemmkonstanten, die aus den LINEWEAVER-BURK-Diagrammen ermittelt wurden, zum Ausdruck. Hier zeigen gegenüber Kalium alle Monodesmethylderivate eine kompetitive Hemmung, darüber hinaus zeigt Imipramin eine kompetitive Hemmung und Chlorpromazin und Promazin eine gemischte Hemmung. Die Änderung des Hemmtyps kann die Wirkungsänderung dieser Verbindungen bei der Metabolisierung bewirken, zumal eine Umwandlung in Basen mit einem höheren pK_a erfolgt, deren Seitenkette mit dem Protein eine stärkere ionogene Bindung eingehen kann.

Darüber hinaus wurden Parallelen zwischen der Hemmung der Na-K-ATPase durch die untersuchten trizyklischen Psychopharmaka und herzwirksame Glykoside aufgezeigt.

6. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1. AHMED, K., J.D. JUDAH:

Preparation of lipoproteins containing cation-dependent ATPase.

Biochim. biophys. Acta (Amst.) 93, 603-613 (1964).

2. AHMED, K., J.D. JUDAH:

On the action of strophanthidin G.

Canad. J. Biochem. 43, 877-880 (1965).

3. AHTHEE, L., M.K. PAASONEN:

Potentiation of 5-hydroxytryptamine release from platelets by desmethylation of chlorpromazine and related agents.

Acta pharmacol. (Kbh.) 26, 213-221 (1968).

4. AKERA, T., T.M. BRODY:

Inhibition of brain sodium- and potassium-stimulated adenosine triphosphatase activity by chlorpromazine free radical.

Molec. Pharmacol. 4, 600-612 (1968).

5. AKERA, T., T.M. BRODY:

The interaction between chlorpromazine free radical and microsomal sodium- and potassium-activated adenosine triphosphatase from rat brain.

Molec. Pharmacol. 5, 605-614 (1969).

6. AKERA, T., T.M. BRODY:

Inhibitory sites on sodium- and potassium-activated adenosine triphosphatase for chlorpromazine free radical and ouabain.

Molec. Pharmacol. 6, 557-566 (1970).

7. ALBERS, R.W.:
Biochemical aspects of active transport.
A. Rev. Biochem. 36, 727-756 (1967).
8. ALBERS, R.W., G.R. DE LORES ARNAITZ, E. DE ROBERTIS:
Sodium-potassium-activated ATPase and potassium-activated p-nitrophenylphosphatase: A comparison of their subcellular localizations in rat brain.
Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 53, 557-564 (1965).
9. ALBERS, R.W., G.J. KOVAL, G.J. SIEGEL:
Studies on the interaction of ouabain and other cardio-active steroids with sodium-potassium-activated adenosine triphosphatase.
Molec. Pharmacol. 4, 324-336 (1968).
10. BICKEL, M.H.:
Untersuchungen zur Biochemie und Pharmakologie der Thymoleptika.
In: Fortschritte der Arzneimittelforschung, hrsg. v. E. JUCKER. 11. Bd., Basel-Stuttgart 1968, S. 121-225.
11. BICKEL, M.H., F. SULSER, B.B. BRODIE:
Conversion of tranquilizers to antidepressants by removal of one N-methyl group.
Life Sci. 4, 247-253 (1963).
12. BICKEL, M.H., M. FLUCKIGER, M. BAGGIOLINI:
Vergleichende Demethylierung von tricyclischen Psychopharmaka durch Rattenleber-Mikrosomen.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmak. exp. Path. 256, 360-366 (1967).

13. BLOOR, J.E., B.R. GILSON, R.J. HAAS, C.L. ZIRKLE:
Electron-donating properties of phenothiazine
and related compounds.
J. med. Chem. 13, 922-925 (1970).
14. BONTING, S.L., K.A. SIMON, N.M. HAWKINS:
Studies on sodium-potassium-activated adenosine
triphosphatase. I. Quantitativ distribution in
several tissues of the cat.
Arch. Biochem. 95, 416-423 (1961).
15. CHARNOCK, J.S., A.S. ROSENTHAL, R.L. POST:
Studies of the mechanism of cation transport.
II. A phosphorylated intermediate in the cation
stimulated enzymic hydrolysis of adenosine tri-
phosphate.
Aust. J. exp. Biol. med. Sci. 41, 675-686 (1963).
16. DAVIS, P.W., T.M. BRODY:
Inhibition of $\text{Na}^+ \text{K}^+$ -activated adenosine tri-
phosphatase activity in rat brain by substitu-
ted phenothiazines.
Biochem. Pharmacol. 15, 703-710 (1966).
17. DEUL, D.H., H. McILWAIN:
Activation and inhibition of adenosine triphos-
phatases of subcellular particles from the brain.
J. Neurochem. 8, 246-256 (1961).
18. FISKE, C.H., Y. SUBBAROW:
The colorimetric determination of phosphorus.
J. biol. Chem. 66, 375-400 (1925).

19. FORREST, I.S., A.G. BOLT, R.C. ABER:
Metabolic pathways for the detoxication of
chlorpromazine in various mammalian species.
Agressologie 9, 259-263 (1968).
20. FORREST, I.S., F.M. FORREST:
On the metabolism and action mechanism of the
phenothiazine drugs.
Exp. Med. Surg. 21, 231-240 (1963).
21. GLASSER, H., J. KRIEGLSTEIN:
Die Eiweißbindung einiger Psychopharmaka mit
trizyklischem Ringsystem in Abhängigkeit von
ihrer chemischen Konstitution.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmak. 265,
321-334 (1970).
22. GLYNN, I.M.:
The activation of cardiac glycosides on ion
movements.
Pharmacol. Rev. 16, 381-407 (1964).
23. GOUZON, B., A. PRUNEYRE, V. DONNET:
Dosage de la chlorpromazine dans différents
secteurs tissulaires.
C.R. Soc. Biol. (Paris) 148, 2039-2040 (1954).
24. GRENELL, R.G., J. MENDELSON, W.D. McELROY:
Effects of chlorpromazine on metabolism in
central nervous system.
Arch. Neurol. Psychiat. (Chic.) 73, 347-351
(1955).

25. HAUSCHILD, F.:
Pharmakologie und Grundlagen der Toxikologie.
Leipzig 1961. 3. Aufl.
26. HOKIN, L.E., D. REASA:
Effect of preincubation of erythrocyte ghosts
on ouabain-sensitive and ouabain-insensitive
adenosine triphosphatase.
Biochim. biophys. Acta (Amst.) 90, 176-177 (1964).
27. HUNTER, A., C.E. DOWNS:
The inhibition of arginase by amino acids.
J. biol. Chem. 157, 427-446 (1945).
28. JÄRNEFELT, J.:
Properties and possible mechanism of the Na^+
and K^+ -stimulated microsomal adenosine triphos-
phatase.
Biochim. biophys. Acta (Amst.) 59, 643-654 (1962).
29. JUDAH, J.D., K. AHMED:
Inhibitors of transport and cation activated
ATP-ases.
J. cell. comp. Physiol. 64, 355-361 (1964).
30. KRIEGLSTEIN, J.:
Charakterisierung und Bedeutung der Albumin-
bindung von Phenothiazinderivaten.
Habil.Schr., Mainz 1970.
31. KUSCHINSKY, G., H. LÜLLMANN:
Kurzes Lehrbuch der Pharmakologie.
4. Aufl., Stuttgart 1970.

32. LINEWEAVER, H., D. BURK:
The determination of enzyme dissociation constants.
J. Amer. chem. Soc. 56, 658-666 (1934).
33. LOHMANN, K., P. LANGEN:
Untersuchungen an kondensierten Phosphaten der Hefe.
Biochem. Z. 328, 1-11 (1956).
34. LOWRY, O.H., N.J. ROSENBROUGH, A.L. FARR, R.J. RANDALL:
Protein measurement with the folin phenol reagent.
J. biol. Chem. 193, 265-275 (1951).
35. LUDEWIG, R., K.H. LOHS:
Akute Vergiftungen.
2. Aufl., Jena 1968.
36. MATSUI, H., A. SCHWARTZ:
ATP-dependent binding of H^3 -digoxin to a Na^+ , K^+ -ATPase from cardiac muscle.
Fed. Proc. 26, 398 (1967).
37. MAXWELL, R.A., P.D. KEENAN, E. CHAPLIN, B. ROTH, S.B. ECKHARDT:
Molecular features affecting the potency of tricyclic antidepressants and structurally related compounds as inhibitors of the uptake of tritiated norepinephrine by rabbit aortic strips.
J. Pharmacol. exp. Ther. 166, 320-329 (1969).
38. McLEAN, A.E.M.:
Ion transport in rat liver slices.
Biochem. J. 87, 161-163 (1963).

39. MOESCHLIN, S.:
Klinik und Therapie der Vergiftungen.
4. Aufl., Stuttgart 1965.
40. NAKAO, T., Y. TASHIMA, K. NAGANO, M. NAKAO:
Highly specific sodium-potassium-activated
adenosine triphosphatase from various tissues
of rabbit.
Biochem. biophys. Res. Commun. 19, 755-758 (1965).
41. NETTER, H.:
Theoretische Biochemie.
Berlin, Göttingen, Heidelberg 1959.
42. PORTIUS, H.J., K. REPKE:
Versuch einer Analyse der Beziehungen zwischen
chemischer Struktur und Digitalis-ähnlicher
Wirksamkeit auf der Rezeptorebene.
Arzneimittel-Forsch. 14, 1073-1077 (1964).
43. POST, R.L., A.K. SEN, A.S. ROSENTHAL:
A phosphorylated intermediate in adenosine tri-
phosphate-dependent sodium and potassium trans-
port across kidney membranes.
J. biol. Chem. 240, 1437-1445 (1965).
44. PRIESTLAND, R.N., R. WHITTAM:
The influence of external sodium ions on the
sodium pump in erythrocytes.
Biochem. J. 109, 369-374 (1968).
45. RAPOPORT, S.M.:
Medizinische Biochemie.
4. Aufl., Berlin 1966.

46. ROBINSON, A.E.:

Biotransformations in vitro undergone by phenothiazine derivatives in a liver preparation.
J. Pharm. Pharmacol. 18, 19-32 (1966).

47. ROBINSON, J.D.:

Kinetic studies on a brain microsomal adenosine triphosphatase. Evidence suggesting conformational changes.
Biochemistry 6, 3250-3258 (1967).

48. ROBINSON, J.D.:

Allosteric interactions with the $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -dependent adenosine triphosphatase.
Nature 220, 1325-1326 (1968).

49. ROBINSON, J.D., J. LOWINGER, B. BETTINGER:

Chlorpromazine: differential effects on membrane-bound enzymes from rat brain.
Biochem. Pharmacol. 17, 1113-1116 (1968).

50. SALZMAN, N.P., B.B. BRODIE:

Physiological disposition and fate of chlorpromazine and a method for its estimation in biological material.
J. Pharmacol. exp. Ther. 118, 46-54 (1956).

51. SCHOLTAN, W.:

Die Bindung der Sulfonamide an Eiweißkörper.
3. Mitteilung: Abhängigkeit der Eiweißbindung vom pH-Wert der Lösung, von der Konstitution der Sulfonamide und von der Art des Eiweißkörpers. (1. Teil).
Arzneimittel-Forsch. 14, 348-356 (1964).

52. SCHWAB, M.:

Störungen des Wasser- und Elektrolythaushalts.
In: Lehrbuch der Inneren Medizin. Hrsg. v.
R. GROSS, D. JAHN, P. SCHÖLMERICH.
2. Aufl., Stuttgart, New York 1970, S. 763-784.

53. SCHWARTZ, A.:

A Na^+ + K^+ -stimulated adenosine triphosphatase
in "microsomal" fractions from rat liver.
Biochim. biophys. Acta (Amst.) 67, 329-331
(1963).

54. SCHWARTZ, A.:

A sodium and potassium-stimulated adenosinetri-
phosphatase from cardiac tissues.
IV. Localization and further studies of a basic
protein inhibitory factor.
Biochim. biophys. Acta (Amst.) 100, 202-214
(1965).

55. SCHWARTZ, A., H. MATSUI, A.H. LAUGHTER:

Tritiated digoxin binding to $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -activated
adenosine triphosphatase: Possible allosteric
site.
Science 160, 323-325 (1968).

56. SCHWARTZ, A., J.C. ALLEN, S. HARIGAYA:

Possible involvement of cardiac Na^+ , K^+ -adenosine
triphosphatase in the mechanism of action
of cardiac glycosides.
J. Pharmacol. exp. Ther. 168, 31-41 (1969).

57. SKOU, J.C.:

The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves.

Biochim. biophys. Acta (Amst.) 23, 394-401 (1957).

58. SKOU, J.C.:

Further investigations on a $Mg^{++} + Na^{+}$ -activated adenosinetriphosphatase, possibly related to the active, linked transport of Na^{+} and K^{+} across the nerve membrane.

Biochim. biophys. Acta (Amst.) 42, 6-23 (1960).

59. SKOU, J.C.:

Preparation from mammalian brain and kidney of the enzyme system involved in active transport of Na^{+} and K^{+} .

Biochim. biophys. Acta (Amst.) 58, 314-325 (1962).

60. SKOU, J.C.:

Enzymatic basis for active transport of Na^{+} and K^{+} across cell membrane.

Physiol. Rev. 45, 596-617 (1965).

61. SKOU, J.C.:

The enzymatic basis for the active transport of sodium and potassium.

Protoplasma (Wien) 63, 303-308 (1967).

62. SOMOGYI, J.:

Preparation of the Na^{+} , K^{+} -activated ATPase system of rat brain free from the Mg^{++} -activated ATP hydrolysing enzyme.

Biochim. biophys. Acta (Amst.) 92, 615-617 (1964).

63. SQUIRES, R.F.:

On the interactions of Na^+ , K^+ , Mg^{++} , and ATP with the Na^+ plus K^+ activated ATPase from rat brain.

Biochem. biophys. Res. Commun. 19, 27-32 (1965).

64. STACH, K., W. PÖLDINGER:

Strukturelle Betrachtungen der Psychopharmaka: Versuch einer Korrelation von chemischer Konstitution und klinischer Wirkung.

In: Fortschritte der Arzneimittelforschung, hrsg. v. E. JUCKER. 9. Bd., Basel-Stuttgart 1966, S. 129-190.

65. TASHIMA, Y., T. NAKAO, K. NAGANO, N. MIZUNO, M. NAKAO:

Partial purification and characterization of sodium- and potassium-dependent adenosine triphosphatase from rat-heart muscle.

Biochim. biophys. Acta (Amst.) 117, 54-62 (1966).

Herrn Dr. J. Michaelis (Institut für Medizinische Statistik und Dokumentation; Direktor: Prof. Dr. Dr. S. Koller) danke ich für die Beratung bei der statistischen Auswertung dieser Arbeit.

Fräulein H. Seufert danke ich für ihre Mithilfe bei der experimentellen Arbeit.

Den Firmen Farbenfabriken Bayer AG, Leverkusen, Geigy AG, Basel, und Wyeth-Pharma GmbH, Münster, danke ich für die Überlassung der Substanzproben.

L E B E N S L A U F

Als Sohn des praktischen Arztes Dr. Josef Hackenberg und seiner Ehefrau Erna, geborene Hart, wurde ich am 18. Juli 1940 in Unter Sandau bei Marienbad geboren.

Meine gesamte Schulbildung absolvierte ich mit tschechischer Unterrichtssprache und zwar 5 Jahre an der Volksschule: 1946-48 in Unter Sandau, 1948-50 in Einsiedel, 1950-51 in Unter Sandau; 3 Jahre an der Mittelschule: 1951-54 in Bad Königswart; 3 Jahre an der Elfjährigen Mittelschule: 1954-57 in Eger. An der letztgenannten Schule legte ich am 5. Juni 1957 das Abitur ab.

In die BRD siedelten wir am 21. Dezember 1957 aus der Tschechoslowakischen Republik um. Hier legte ich am 18. April 1958 in München die Ergänzungsprüfung für Inhaber ausländischer Vorbildungsnachweise ab. Anschließend trat ich meine Praktikantenzeit in der Scheldep Apotheke in Niederscheld (Dillkreis) an, die bis zum März 1960 dauerte. Während dieser Zeit bestand ich in Wiesbaden eine Prüfung in der lateinischen Sprache (Kleines Latinum) und gleichfalls in Wiesbaden im Februar 1960 die pharmazeutische Vorprüfung.

Das Pharmaziestudium begann ich im SS 1960 an der Universität in Münster; im WS 1961/62 studierte ich an der Universität in Innsbruck. Von da kam ich zum SS 1962 wieder nach Münster und legte nach dem WS 1962/63, dem 6. Semester, das pharmazeutische Staatsexamen ab.

Während des SS 1963 ging ich an die Philipps-Universität nach Marburg, wo ich mein Studium fortsetzte und unter Leitung von Herrn Professor Dr. P.H. List eine Dissertation "Über die scharf schmeckenden Stoffe des Wolligen Milchlings, *Lactarius vellereus* FRIES" anfertigte.

In dieser Zeit war ich zwei Jahre mit der Verwaltung einer wissenschaftlichen Assistentenstelle in pharmazeutischer Technologie beauftragt. Am 1. November 1967 legte ich die mündliche Prüfung zur Erlangung des "Dr. rer. nat." ab.

Nachdem ich unter Anrechnung des pharmazeutischen Staatsexamens und der Promotionsprüfung die naturwissenschaftliche Vorprüfung für Mediziner erlangt hatte, studierte ich in Marburg bis zum SS 1968 die vorklinischen Fächer und legte am 18. September 1968 die ärztliche Vorprüfung ab. Nach einem weiteren Semester in Marburg ging ich zum SS 1969 an die Universität Wien und von da zum WS 1969/70 an die Universität nach Mainz, wo ich nach dem SS 1971 das medizinische Staatsexamen am 10. Dezember 1971 abgelegt habe.

